

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業
(英語) Development of Medical Devices and Systems for Advanced Medical Services

研究開発課題名： (日本語) 立体造形による機能的な生体組織製造技術の開発／細胞を用いた機能的な立体臓器作製技術の研究開発／組織工学を用いたヒト心臓壁立体造形技術の開発
(英語) Development of technology to produce biologically functional body tissues by steric fabrication / Research and development of technology to prepare the steric organ of biological function by utilizing cells / Development of steric fabrication technology to prepare human heart wall by utilizing tissue engineering

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学ウイルス・生医科学研究所 教授 田畑泰彦
所属 役職 氏名： (英語) Professor Yasuhiko Tabata, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 山下潤
所属 役職 氏名： (英語) Professor Jun Yamashita, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University
(日本語) 国立大学法人京都大学大学院医学研究科心臓血管外科 教授 湊谷謙司
(英語) Professor Kenji Minatoya, Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

本テーマの目的は、ヒト細胞を用いた心臓再生幹細胞生物学と組織工学を融合することにより、高い生物機能と十分な厚みをもつ移植部分臓器としての心筋組織の立体造形技術を研究開発することである。本目的を達成するため、平成28年度は、国立大学法人京都大学、旭硝子株

式会社、および iHeart Japan 株式会社が連携し、①立体造形ヒト心臓壁の作製と評価、②心臓疾患動物を用いた立体造形ヒト心臓壁の有効性評価と機能評価技術の開発、および③立体造形ヒト心臓壁の事業化へ向けた検討についての研究開発を実施した。

①立体造形ヒト心臓壁の作製と評価 <国立大学法人京都大学、旭硝子株式会社、および iHeart Japan 株式会社>

まず、細胞シートの積層化におけるゼラチンハイドロゲルマイクロスフェア (GHM) あるいはフッ素系高分子からなる中空糸 (F-Fiber) の挿入効果について検討した。シート形成の細胞源として、ヒト間葉系幹細胞およびヒト iPS 細胞から心筋、内皮、および壁細胞を同時に分化誘導した細胞 (混合ヒト細胞) を用いた。細胞シート積層における GHM の挿入効果においては、細胞シートへの GHM 被覆率および歩留まりを算出するとともに、GHM 挿入による構成細胞の生物活性および酸素状態を調べた。GHM の存在により、構成細胞の生物活性および酸素状態が変化することが明らかとなった。細胞シート積層体における F-Fiber の挿入効果においては、酸素状態および代謝に関連する細胞内物質の発現を評価した。F-Fiber 挿入によって、これまでになく厚い細胞シート積層体においても酸素および代謝状態が改善されることがわかった。次に、細胞源として健常人由来 HLA ホモ iPS 細胞の利用を検討した。複数の HLA ホモ iPS 細胞株において、混合ヒト細胞を分化誘導し、シート化する方法を開発、最適化している。さらに、臨床応用を考え、サイズの大きい細胞シート積層体を迅速に作製する手法についても検討しているところである。

②心臓疾患動物を用いた立体造形ヒト心臓壁の有効性評価と機能評価技術の開発<国立大学法人京都大学および旭硝子株式会社>

まず種々の心臓疾患動物モデルを作製し、それらの心臓疾患モデルに対する GHM を添加した混合ヒト細胞シートの積層体 (積層化混合ヒト細胞シート) の有効性を検討した。ラット亜急性心筋梗塞、ブタ亜急性心筋梗塞、およびハムスター心筋症に対し、優れた有効性をもつことがわかった。臨床応用に向けた製品開発のためには、ヒト心臓に見合ったサイズの細胞シート積層体の構築、およびその品質の時間安定性を示すことが求められる。そこで、積層化混合ヒト細胞シートの組織サイズ、収縮力、および収縮率の測定を行った。さらに、積層化混合ヒト細胞シートの in vivo 有効性を in vitro で評価できる手法について検討しているところである。

③立体造形ヒト心臓壁の事業化へ向けた検討<iHeart Japan 株式会社>

積層化混合ヒト細胞シートを作製するために必要な原材料をリストアップし、臨床応用における安全性および品質の面から精査した。現在、改善すべき点について対処しているところである。

(英文)

The objective of this research project is to research and develop 3-dimensional (3D) steric fabrication technology of human heart wall as a partial myocardial organ implantable with high biological functions and therapeutically acceptable thickness. This 3D fabrication is practically realized only by fusing technologies of human stem cell biology for heart regeneration and tissue engineering. To achieve the objective, the following studies were carried out in the semester of 2016 by the research cooperation of Kyoto University, Asahi Glass Co. Ltd., and iHeart Japan Corporation; (i) the design and creation of human heart walls by the 3D fabrication technology, (ii) the evaluation of human heart walls prepared by the 3D fabrication technology with the animal models of heart disease, and (iii) the preparation aiming at the commercialization of heart wall prepared by the 3D fabrication technology.

(i) The design and creation of human heart walls by the 3D fabrication technology (Kyoto University, Asahi Glass Co. Ltd., and iHeart Japan Corporation)

First, the insertion effects of gelatin hydrogel microspheres (GHM) or hollow fibers of fluorinated polymers (F-Fiber) were evaluated in the formation of layered construct of cell sheets. Human mesenchymal stem cells or mixed cells composed of three types of cardiovascular cell populations (myocardial, endothelial, and vascular mural cells) simultaneously differentiated from human induced pluripotent stem (iPS) cells, were used as cell sources for the sheet preparation. The extent of GHM covering and remaining on the cell sheet was measured for the layered construct. In addition, the biological activities of cells and the oxygen condition in the layered construct inserted with or without GHM were investigated. It was found that the biological activities of cells and the oxygen condition in the layered construct of cell sheets were positively improved by the insertion of GHM. The oxygen condition and expression level of intracellular substances related to metabolism were evaluated for the multiple layered construct obtained by the further layering of layered constructs of cell sheet through the insertion with F-Fiber. It was found that the conditions of oxygen and metabolism were improved for the multiple layered construct even with a large thickness by the insertion with F-fiber. Next, a preparation method of mixed cell sheet clinically available was developed by changing cell sources to one line of iPS cells with homozygous human leucocyte antigens (HLA) derived from healthy human. The method of simultaneous differentiation into three types of cardiovascular cell populations and sheet formation are being developed and optimized. Furthermore, considering the clinical application, the methods to prepare a large layered construct of cell sheets or to rapidly layer cell sheets are also being developed.

(ii) The evaluation of human heart walls prepared by the 3D fabrication technology with the animal models of heart disease (Kyoto University and Asahi Glass Co. Ltd.)

First, various heart disease models were prepared and the therapeutic efficiency of layered constructs of cell sheets from human mixed cells (layered construct of human mixed cell sheets) for these models was evaluated. It was demonstrated that the layered construct of human mixed cell sheets was effective for the models of acute myocardial infarction in rats and swine as well as cardiomyopathy in hamsters. For the development of product aiming at the clinical application, it is indispensable to investigate the size and mechanical properties of layered constructs of cell sheets as well as their preservation stabilities. The size, contractive force, and contractive rate of layered construct of human mixed cell sheets were measured. Furthermore, methods to *in vitro* evaluate the layered construct of human mixed cell sheets considering connecting its *in vivo* efficiency, are being explored.

(iii) The preparation aiming at the commercialization of heart wall prepared by the 3D fabrication technology (iHeart Japan Corporation)

Materials necessary to prepare the layered construct of human mixed cell sheets with the clinical grade were listed while the possibility and feasibility were investigated from the viewpoint of safety and quality for clinical use. Now appropriate solutions are being addressed for the point to be improved.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, Yuan F, Ye F, Kowalski WJ, Minakata K, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. The myocardial regenerative potential of three-dimensional engineered cardiac tissues composed of multiple human iPS cell-derived cardiovascular cell lineages. Sci Rep. 2016, 6, 29933.
2. Yamashita JK. Expanding Reprogramming to Cardiovascular Progenitors. Cell Stem Cell. 2016, 18, 299-301.

3. Masumoto H, Yamashita JK. Untiring steps toward the maturation of human stem cell-engineered heart tissue. Ann Transl Med. 2017, 5, 87.
4. Masumoto H, Yamashita JK. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Sheets: a Platform for Cardiac Regeneration. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2016, 18, 65.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Generation of 3-dimensional cardiac tissue with human iPS cells and tissue engineering, 口演, Masumoto H, The 9th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC), 2016/5/14-16, 国外.
2. Cardiovascular reconstitution from pluripotent stem cells, 口演, Jun K. Yamashita, Hypertension Summit 2016, 2016/5/31, 国内
3. 多能性幹細胞を用いた3D組織構築, 口演, 山下潤, 日本炎症再生医学会シンポジウム「血管新生制御と3D組織構築」, 2016/6/16, 国内
4. 心臓血管領域における再生治療の展望, 口演, 南方 謙二, 升本 英利, 池田 義, 第37回日本炎症・再生医学会, 2016/6/16-17, 国内.
5. 多能性幹細胞の心血管分化機構と再生医療応用, 口演, 山下潤, 生化学会近畿支部シンポジウム, 2016/6/21, 国内
6. Therapeutic potential of human iPS cell-derived engineered cardiac tissue including cardiomyocytes and multiple vascular lineages for myocardial infarction, ポスター, Masumoto H, Nakane T, J P. Tinney, F Yuan, F Ye, W J. Kowalski, Minakata K, Sakata R, Yamashita J.K., Keller BB, International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 2016/6/22-25, 国外.
7. ヒト iPS 細胞由来心臓構成細胞を含む三次元人工心筋組織移植による心筋再生についての検討, ポスター, 升本 英利, 中根 武一郎, Joseph Tinney, 南方 謙二, 坂田 隆造, 山下潤, Bradley Keller, 第37回日本炎症・再生医学会, 2016/6/16-17, 国内.
8. 多能性幹細胞を用いた系統的心血管分化と3次元的心臓組織構築, 口演, 山下潤, 第26回日本サイトメトリー学会・シンポジウム1「多能性幹細胞の戦略的分化誘導と応用への道のり」, 2016/7/23, 国内
9. 自然治癒力を高めて病気を治す再生医療ー高分子材料の重要性ー, 口演, 田畑泰彦, 高分子学会高分子同友会, 2018/7/26, 国内.
10. Implantation of human iPS cell-derived engineered cardiac tissues including cardiomyocytes and multiple vascular lineages ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in a rat model, ポスター, Masumoto H, Nakane T, J P. Tinney, F Yuan, W J. Kowalski, Minakata K, Sakata R, European Society of Cardiology (ESC) Congress, 2016/8/26-30, 国外.
11. Drug Delivery Technology to Realize Tissue Regeneration, 口演, Tabata, Y., TERMIS-AP 2016, 2016/9/3-6, 国外.
12. バイオマテリアルから見た再生医療の最前線ー細胞能力を高める医療の実現ー, 口演, 田畑泰彦, 第159回日本獣医学会学術集会, 2016/9/8, 国内.
13. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞および血管構成細胞を含む三次元人工心筋組織による心筋再生につ

- いての検討, 口演, 升本 英利, 中根 武一郎, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造, 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2016/9/28-10/1, 国内.
14. 拡張型心筋症ハムスターに対するヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植の有効性, 口演, 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造, 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2016/9/28-10/1, 国内.
 15. ヒト iPS 細胞由来心筋・血管系細胞を用いた移植用大型心臓パッチの開発, 口演, 中根 武一郎, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造, 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2016/9/28-10/1, 国内.
 16. Combined transplantation of human iPS cell-derived cardiac tissue sheets and sustained-release of bFGF improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model, 口演, 李 子澎, 升本 英利, 南方 謙二, 川東 正英, 瀧本 真也, 平間 大介, 平尾 慎吾, 池田 義, 坂田 隆造, 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2016/9/28-10/1, 国内.
 17. iPS 細胞を用いた心臓再生の試みー幹細胞から 3 次元的に組織を作るー, 口演, 山下潤, 日本フットケア学会特別講演, 2016/10/9, 国内
 18. Generation of 3-Dimensional Cardiac Tissue using induced pluripotent stem cells, 口演, Jun K. Yamashita, Swiss-Kyoto Symposium, Kyoto, 2016, 2016/11/1, 国内
 19. Bioengineered cardiac cell sheets, 口演, Masumoto H, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions, 2016/11/12-16, 国外.
 20. Impact of geometry and cell density on structural and functional maturation in large-format mesh engineered cardiac tissues, 口演, Nakane T, Masumoto H, J P. Tinney, F Yuan, W J. Kowalski, F Ye, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita J.K, Keller BB, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions, 2016/11/12-16, 国外.
 21. Sequential treatment with sustained-release of basic fibroblast growth factor followed by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model, ポスター, Zipeng Li, Masumoto H, Minakata K, Kawatou M, Takimoto S, Hirao S, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Sakata R, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions, 2016/11/12-16, 国外.
 22. A technology for cardiac regeneration using human iPS cell-derived cardiac tissue including multiple cardiovascular lineages, ポスター, Masumoto H, Yamamizu K, Ikuno T, Takakubo H, Minakata K, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions, 2016/11/12-16, 国外.
 23. The efficacy of transplantation of human iPS cell derived cardiac tissue for dilated cardiomyopathy hamster model, ポスター, Takimoto S, Masumoto H, Minakata K, Tabata Y, Yamashita J.K, American Heart Association (AHA) Scientific Sessions, 2016/11/12-16, 国外.
 24. ヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植はブタ心筋梗塞モデルにおいて不整脈リスクを増大させることなく心機能を改善する, 口演, 青木 隆之, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造, 第 15 回日本心臓血管外科再生治療研究会, 2016/2/15, 国内.

25. 多能性幹細胞由来バイオエンジニアリング心臓組織の外科的移植による心筋再生研究, 口演, 升本 英利, 坂田 隆造, 湊谷 謙司, 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017/2/27-3/1, 国内.
26. Spring-8における位相差CTによる拡張型心筋症ハムスターに対する立体的組織評価の確立, 口演, 平尾 慎吾, 南方 謙二, 升本 英利, 瀧本 真也, 坂本 和久, 中津 太郎, 中田 朋宏, 山崎 和裕, 池田 義, 湊谷 謙司, 坂田 隆造, 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017/2/27-3/1, 国内.
27. 慢性期ラット心筋梗塞に対する bFGF 徐放後ヒト iPS 由来心筋組織シート移植の治療効果, 口演, 李 子澎, 升本 英利, 南方 謙二, 川東 正英, 瀧本 真也, 平尾 慎吾, 池田 義, 坂田 隆造, 湊谷 謙司, 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017/2/27-3/1, 国内.
28. 拡張型心筋症ハムスターに対するヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植の有効性, 口演, 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司, 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017/2/27-3/1, 国内.
29. ヒト iPS 細胞由来心筋・血管系細胞を用いた移植用網目状心臓組織パッチの開発, 口演, 中根 武一郎, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司, 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2017/2/27-3/1, 国内.
30. ヒト iPS 細胞由来心筋・血管系細胞を用いた移植用網目状心臓組織パッチの開発, 口演, 中根 武一郎, 升本 英利, 池田 義, 湊谷 謙司, 山下 潤, Bradley B.Keller, 第 16 回日本心臓血管外科再生治療研究会, 2017/2/27, 国内.
31. Regeneration Therapy Based on Drug Delivery Technology, 口演, Tabata, Y., International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History, 2017/3/9-10, 国内
32. Mesh-shaped engineered cardiac tissue generated from human iPS cell for cardiac regeneration, ポスター, Nakane T, Masumoto H, Minakata K, Ikeda T, Minatoya K, Yamashita J, Sakata R. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017/3/17-19, 国内.
33. Sequential treatment with sustained-release of basic FGF followed by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model, 口演, Li Z, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017/3/17-19, 国内.
34. Three-dimensional visualization and morphometry of cardiac tissue in a hamster DCM model by synchrotron radiation-based x-ray phasecontrast imaging at SPring-8, 口演, Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Takimoto S, Hoshino M, Yagi N, Shirai M, Minatoya K, Sakata R, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017/3/17-19, 国内.
35. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue ameliorates heart failure in delayed cardiomyopathy of hamster model, ポスター, 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司, 坂田 隆造, 山下 潤, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017/3/17-19, 国内.
36. iPS 細胞由来ミニ 3D 組織を用いた新しい病態モデル, 口演, 山下 潤, 第 81 回日本循環器学会学術集会・会長特別企画 6 「疾患 iPS 細胞—臨床応用の現状と展開」, 2017/3/17, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 大手前サマースクール、田畑泰彦、京都、2016/7/22、国内
2. 四天王寺中学校サマースクール、田畑泰彦、京都、2016/8/29、国内
3. 京大オープンキャンパス：ものづくりで病気を治す ―自由な異分野融合で先端医療を拓く―、田畑泰彦、京都、2016/8/9、国内
4. 再生医療ビジネスシンポジウム in KRP Part IX：細胞を元気にするための「モノづくり技術」＝再生医療サポートビジネス、田畑泰彦、京都、2016/9/13、国内
5. 芦屋川カレッジ：自然治癒力を高めて病気を治す①～再生医療の実際～、田畑泰彦、芦屋、2016/9/28、国内
6. 医工学フォーラム特別講演会：ヒト iPS 細胞を用いた新しい3次元的心臓組織モデル、山下潤、京都、2017/2/8、国内
7. KIPS 高分子講座：生体機能性高分子-からだを治すポリマー（生物医学研究から先端医療を支える高分子技術）、田畑泰彦、京都、2016/2/15、国内
8. 芦屋カレッジ修了記念講演：自然治癒力を高めて病気を治す②～再生医療はここまできている～、田畑泰彦、芦屋、2016/3/15、国内
9. AMED 国際ワークショップ：Regenerative Medicine Based on the activation of cells by Biomaterials Technology、田畑泰彦、New York、2016/3/17-19、国外

(4) 特許出願

該当なし。